



PATENT

#4
5/30/02

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Antonio FACCHIANO et al.
Appl. No.: 10/077,746 Group: 1646
Filed: February 20, 2002 Examiner: Unassigned
For: PEPTIDE INHIBITING PLATELET DERIVED
GROWTH FACTOR (PDGF-BB) AND FIBROBLAST
GROWTH FACTOR (bFGF) ACTIVITY

TECH CENTER 1600/2900

MAY 10 2002

RECEIVED

LETTER

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Date: May 8, 2002

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
ITALY	RM2001 A 000088	FEBRUARY 21, 2001

A certified copy of the above-noted application is attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 25-0120 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

YOUNG & THOMPSON

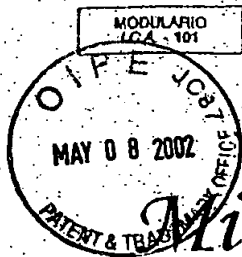
By

Benoit Castel
Benoit Castel, # 35,041

Ref. 2507-1003

745 South 23rd Street, Suite 200
Arlington, Virginia 22202
(703) 521-2297

Attachment



Mod. C.E. - 1-4-7

Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N.

RM2001 A 000088

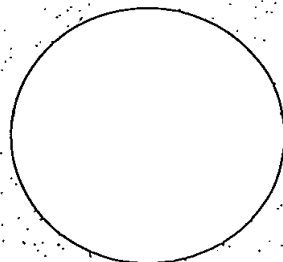
Invenzione Industriale

RECEIVED
MAY 10 2002
TECH CENTER 1600/2900

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Roma, li

4 MAR. 2002



X IL DIRIGENTE

Ing. DI CARLO

[Handwritten signature]

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione PROVINCIA ITALIANA DELLA CONGREGAZIONE DEI FIGLI DELL'IM-
 Residenza ROMA - IT codice _____

2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome SARPI Maurizio, FEZZARDI Antonio e MANNI Lina
 denominazione studio di appartenenza STUDIO FERRARIO
 via Collina n. 36 città ROMA cap 00187 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

Vedi sopra.
 via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

"PEPTIDE IN GRADO DI INIBIRE L'ATTIVITA' DEL FATTORE DI CRESCITA
DERIVATO DALLE PIASTRINE (PDGF-BB) E DEL FATTORE DI CRESCITA DERI-
VATO DAI FIBROBLASTI (bFGF) "

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) FACCHIANO, Antonio 3) FACCHIANO, Angelo
 2) FACCHIANO, Francesco 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) NESSUNA _____
 2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV n. pag. 19 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) _____
 Doc. 2) ☒ PROV n. tav. 07 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) _____
 Doc. 3) ☐ RIS lettera d'incarico, XXXXXX _____
 Doc. 4) ☐ RIS designazione inventore _____
 Doc. 5) ☐ RIS documenti di priorità con traduzione in italiano _____
 Doc. 6) ☐ RIS autorizzazione o atto di cessione _____
 Doc. 7) ☒ nominativo completo del richiedente _____

8) attestati di versamento, totale lire 565.000.= obbligatorio

COMPILATO IL 21/02/2001 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) SARPI Maurizio
dello STUDIO FERRARIO

CONTINUA SINO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA

RM 2001 A 000088

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA _____ Reg. A
 L'anno DUEMILAUNO il giorno VENTUNO del mese di FEBBRAIO

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE
Silvia Allari

RM2001 A 000088

NOMINATIVO COMPLETO DEL RICHIEDENTE IN RELAZIONE ALLA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

DEPOSITATA IN DATA 21.02.2001 DOMANDA No.

AVENTE PER TITOLO: "PEPTIDE IN GRADO DI INIBIRE

L'ATTIVITA' DEL FATTORE DI CRESCITA DERIVATO DALLE

PIASTRINE (PDGF-BB) E DEL FATTORE DI CRESCITA DERIVATO

DAI FIBROBLASTI (bFGF) ".

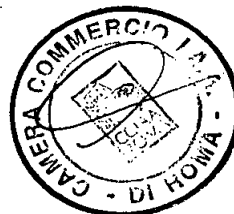
• PROVINCIA ITALIANA DELLA CONGREGAZIONE DEI FIGLI

DELL'IMMACOLATA CONCEZIONE - ISTITUTO DERMOPATICO

DELL'IMMACOLATA -

Via dei Monti di Creta, n. 104

00167 ROMA



Roma 21 Febbraio 2001

Per La Richiedente

Il Rappresentante

Maurizio SARPI

dello

Studio FERRARIO

NUMERO DOMANDA

RM 2001 A 000588

REG. A

DATA DI DEPOSITO

DATA DI DEPOSITO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

PROVINCIA ITALIANA DELLA CONGREGAZIONE DEI FIGLI DELL'IMMACOLATA
CONCEZIONE - ISTITUTO DERMOPATICO DELL'IMMACOLATA.
Via dei Monti di Creta, 104 - 00167 Roma.

D. TITOLO

PEPTIDE IN GRADO DI INIBIRE L'ATTIVITÀ DEL FATTORE DI
CRESCITA DERIVATO DALLE PIASTRINE (PDGF-BB) E DEL FATTORE DI
CRESCITA DERIVATO DAI FIBROBLASTI (bFGF).

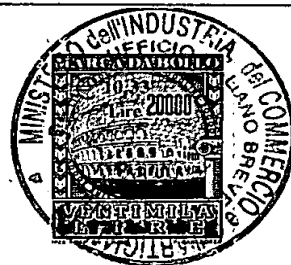
Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Viene identificato un peptide, derivato dal fattore di crescita prodotto dai fibroblasti (bFGF). Tale molecola è in grado di inibire in vitro gli effetti del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-BB) ed il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) sulle cellule della muscolatura liscia di ratto (RASMCI) e sulle cellule dell'endotelio di bovino (BAEC). Tale molecola è anche in grado di inibire in vivo l'angiogenesi in topi CD1.

M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

" PEPTIDE IN GRADO DI INIBIRE L'ATTIVITÀ DEL FATTORE DI CRESCITA DERIVATO DALLE PIASTRINE (PDGF-BB) E DEL FATTORE DI CRESCITA DERIVATO DAI FIBROBLASTI (bFGF)";

a nome della PROVINCIA ITALIANA DELLA CONGREGAZIONE DEI FIGLI DELL'IMMACOLATA CONCEZIONE - ISTITUTO DERMOPATICO DELL'IMMACOLATA, di nazionalità italiana con sede a 00167 Roma, Via dei Monti di Creta 104.

Inventori designati: Antonio Facchiano, Francesco Facchiano, Angelo Facchiano

Il presente trovato riguarda l'identificazione e la sintesi di un peptide, derivato dal fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) avente la seguente struttura primaria:

Asp-Pro-His-Ile-Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu
che verrà qui di seguito denominato PEP1.

Tale molecola analoga ad una sequenza propria della struttura di bFGF, si è rivelata in grado di inibire *in vitro* ed *in vivo* gli effetti prodotti dal fattore di crescita derivati dalle piastrine (PDGF-BB) ed inibire gli effetti del fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF).

In particolare, le prove *in vitro* effettuate su cellule muscolari di ratto (RASM) e cellule primarie

endoteliali di bovino (BAEC) hanno evidenziato l'efficacia del trovato nell'inibire la proliferazione e la migrazione cellulare ad una concentrazione tale da non risultare tossico per le cellule.

Inoltre, le prove effettuate *in vivo*, su placche di matrice extra-cellulare ricostruita, iniettate per via sottocutanea in topi CD1, hanno dimostrato la capacità del trovato di inibire l'angiogenesi indotta dal bFGF.

I dati ottenuti suggeriscono che PEP1 è potenzialmente utile nel trattamento di patologie con disordini nella proliferazione e migrazione delle cellule vascolari, come la ri-stenosi dopo angioplastica, l'aterosclerosi, la crescita tumorale e la diffusione delle metastasi.

I fattori di crescita, come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-BB) e il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF), svolgono un ruolo di primaria importanza nella proliferazione e differenziamento di molti tipi cellulari. Infatti, l'aumento della concentrazione e/o dell'attività di questi fattori è correlata all'insorgenza di molte patologie, fra cui la crescita tumorale e le malattie vascolari come l'aterosclerosi.

Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-BB) e il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) sono entrambi essenziali nella patogenesi delle malattie connesse all'angiogenesi, poiché direttamente coinvolti nella migrazione e proliferazione cellulare all'interno delle pareti vascolari (Ross, R., et al. 1990, Science, 248, 1009-1012; Ross, R. 1993, Nature, 362, 801-809).

L'angiogenesi è un processo fondamentale che influisce sullo sviluppo dei tessuti, così come sulla crescita tumorale e sulla sua diffusione. Essa è controllata da numerosi fattori capaci di modulare il differenziamento, la proliferazione e la migrazione cellulare (Holash, J., 1999, Oncogene, 18, 5356-5362; Zetter, B.R. et al., 1998, Annu. Rev. Med., 49, 407-424).

In vivo sono state utilizzate con successo varie molecole per inibire patologie associate a disturbi della proliferazione/migrazione delle cellule vascolari (come la ri-stenosi) come anticorpi neutralizzanti diretti contro il PDGF e il bFGF (Rutherford et al., Atherosclerosis, 1997, 45-51), e oligonucleotidi in grado di inibire l'espressione del recettore del PDGF (Sirois, M.G. et al., 1997, Circulation, 95, 669-676). Inoltre, sono attualmente

disponibili altri inibitori specifici, capaci di interferire con il legame al recettore, o con la sua dimerizzazione, oppure con la trasmissione del segnale che esso determina (Heldin, C.H. et al., 1998, BBA, F79-F113).

PDGF e bFGF sono necessari per la crescita delle cellule tumorali *in vitro*, per la crescita dei tumori solidi *in vivo*, così come per la diffusione delle metastasi (Shawver, L.K. et al., 1997, Clin. Cancer Res., 3, 1167-1177; Vignaud, J.M. et al., 1994, Cancer Res., 54, 5455-5463; Chandler, L.A. et al., 1999, Int. J. Cancer, 81, 451-458; Westphal, J. R. et al., 2000, Int. J. Cancer, 15,86 (6), 768-776).

Attraverso l'inibizione dell'attività e/o del segnale del PDGF e del bFGF, si ottiene una riduzione effettiva della crescita tumorale ed una diminuzione della diffusione delle metastasi (Abramovich, R. et al., 1999, Br. J. Cancer, 79 (9-10), 1392-8; Bagheri-Yarmand, R. et al., 1998, Br. J. Cancer, 78 (1), 1118; Sola, F. et al, 1995, Invasion Metastasis, 15 (5-6), 222-231; Wang, Y. et al., 1997, Nature Med., 3, 887-893).

Pertanto, antagonisti specifici per il PDGF e il bFGF sono potenziali candidati per il trattamento di



malattie proliferative e malattie connesse all'angiogenesi.

In accordo con dati recentemente ottenuti da uno degli inventori, il PDGF-BB e il bFGF hanno un ruolo insospettato nella modulazione delle loro funzioni pro-angiogeniche. In particolare, è stato dimostrato che il bFGF, oltre ad avere il noto effetto pro-angiogenico, può giocare anche un effetto inibitorio sulla proliferazione e migrazione delle cellule (Facchiano, A. et al., 2000, J. Cell. Sci., 113, 2855-2863).

Inoltre, sono stati studiati i fattori che possano influenzare la conformazione tridimensionale di queste e quali siano le relazioni esistenti tra la conformazione e le funzioni biologiche (Ragone, R. et al., 1987, Italian J. of Biochem., 36, 306-309; Facchiano, F. et al., 1988, CABIOS, 4, 2, 303-305; Ragone, R. et al., 1989, Protein Engineering, 2, 7, 497-504; Facchiano, A. M. et al., 1989, CABIOS, 5, 4, 299-303; Facchiano, A.M. et al., 1991, CABIOS, 7, 3, 395-396; Facchiano, A. et al., 1993, J. Mol. Evol., 36 (5), 448-457; Benvenaga, S. et al., 1993, EOS-J. of Immunol. and Immunopharm., 13 (1), 18-19; Facchiano, A., 1995, J. Mol. Evol., 40, 570-577; Facchiano, A., 1996, Trends in Genetics, 12(5), 168-169; Scarselli,

M. et al., 1997, J. Peptide Sci., 3, 1-9; Benvenaga, S. et al., 1999, Amyloid, 6 (4), 250-255; Facchiano, A.M., 1999, Protein Eng., 12 (10), 893; Pozzetto, U. et al., 2000, Transplant Int., Suppl. n. 1, 13, S306-S310; Facchiano, A. M., 2000, Bioinformatics, 16 (3), 292-293).

Nella presente invenzione, attraverso un metodo di analisi di struttura, sono state identificate le regioni della sequenza aminoacidica del bFGF potenzialmente responsabili della sua attività biologica. Fra queste, un peptide avente la seguente struttura primaria:

Asp-Pro-His-Ile-Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu

(di qui in poi denominato PEP1), derivato dal bFGF umano si è dimostrato capace di indurre *in vitro* una forte inibizione degli effetti prodotti dal bFGF, dal PDGF-BB e dal siero fetale bovino (FCS), come la proliferazione e la migrazione cellulare osservata in cellule primarie muscolari lisce di ratto (RASM) e in cellule primarie endoteliali bovine (BAEC). Tale attività inibitoria è stata osservata ad una dose piuttosto bassa, pari a 10 nanogrammi/millilitro, alla quale il PEP1 non risulta tossico *in vitro*. Come controllo sono state usate la forma denaturata al calore del peptide PEP1 in cui l'ordine degli

amminoacidi è stato riarrangiato casualmente: entrambe non mostrano alcuna attività.

Il peptide PEP1 presenta inoltre una attività inibitoria significativa anche *in vivo*; esso, infatti, è in grado di inibire l'angiogenesi in placche di matrice extra-cellulare ricostruita iniettate per via sottocutanea in topi CD1.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

In accordo con quanto sin qui osservato, il peptide PEP1, è stato sintetizzato con un sintetizzatore automatico, usando la tecnica di sintesi standard denominata f-moc.

In seguito, tre differenti campioni del peptide PEP1 sono stati testati e hanno dato risultati simili nei saggi biologici effettuati. Inoltre, è stata preparata una versione del peptide riarrangiata casualmente (PEP1scr) usata, in seguito, come controllo negativo in tutti gli esperimenti condotti.

Su tale molecola sono stati effettuati una serie di test *in vitro* ed *in vivo* che hanno indicato le caratteristiche funzionali di tale peptide.

I risultati di tali test sono riportati nelle figure allegate in cui:

la Fig.1 mostra i risultati di esperimenti di dose dipendenza condotti su cellule RASMC, in cui la

proliferazione è indotta da FCS (10%), e valutata dopo 48 ore in presenza ed in assenza di PEP1 a concentrazioni comprese tra 1g/ml e 1 pg/ml;

la Fig.2A mostra l'effetto del PEP1 e del PEPscr sulla proliferazione indotta da PDGF-BB (10ng/ml) in cellule RASMC;

la Fig.2B mostra l'effetto del PEP1 e del PEPscr sulla proliferazione spontanea, in presenza di BSA, in cellule RASMC;

la Fig.3A mostra l'effetto del PEP1 e del PEPscr sulla proliferazione indotta da PDGF-BB (10ng/ml) in cellule BAEC;

la Fig.3B mostra l'effetto del PEP1 e del PEPscr sulla proliferazione spontanea, in presenza di BSA, in cellule BAEC;

la Fig.4A mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr (10ng/ml) sulla migrazione cellulare indotta da FCS (1%) in cellule BAEC;

la Fig.4B mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr (10ng/ml) sulla migrazione cellulare indotta da PDGF-BB (10 ng/ml) in cellule BAEC;

la Fig.4C mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr (10ng/ml) sulla



migrazione cellulare indotta da bFGF (10 ng/ml) in cellule BAEC;

la Fig.5A mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr sulla migrazione cellulare indotta da EGF (10ng/ml) in cellule BAEC;

La Fig.5B mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr sulla migrazione cellulare indotta da aFGF (10ng/ml) in cellule BAEC;

la Fig.5C mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr sulla migrazione cellulare indotta da Fibronectina (10ng/ml) in cellule BAEC;

la Fig.5D mostra l'effetto della presenza e dell'assenza di PEP1 e PEPscr sulla migrazione cellulare indotta da VEGF (10ng/ml) in cellule BAEC;

la Fig.6 mostra l'effetto di PEP1 e PEPscr sulla migrazione cellulare indotta da PDGF-BB (10ng/ml) in cellule RASMC;

la Fig.7 mostra l'effetto di PEP1 e PEPscr sulla angiogenesi indotta da bFGF in placche di matrice extra-cellulare ricostruita, iniettate in topi CD1.

TEST DELL'ATTIVITA' IN VITRO DEL PEPTIDE PEP1

Per questo studio sono state utilizzate cellule muscolari primarie di aorta di ratto (RASMC) ottenute da ratti maschi di ceppo "Wistar" di sei mesi di età,

secondo una tecnica già nota (Sterpetti, A. V. et al., 1992, J. Vasc. Surg., 6, 16-20); cellule primarie endoteliali di aorta bovino (BAEC) ottenute secondo protocolli noti (D'Arcangelo, D. et al., 2000, *Circ.Res.*, 86, 312-318).

SAGGIO DI MIGRAZIONE

La migrazione cellulare è un processo fondamentale nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni. Pertanto l'effetto di PEP1 sulla migrazione indotta da diversi fattori chemio-attrattivi è stata testata principalmente su cellule endoteliali (BAEC). I saggi di migrazione sono stati effettuati in camere di Boyden modificate (prodotte da Neuroprobe Inc.), secondo la tecnica standar già nota (Albini, A. et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61, 121-129; Facchiano, A. et al., 2000, *J. Cell. Sci.*, 113, 2855-2863). Le cellule sono state poste nella parte superiore della camera dell'apparato di Boyden. Come fattori chemio-attrattivi sono stati utilizzati il siero fetale bovino (FCS) al 10%; i seguenti fattori ricombinanti umani: PDGF-BB, bFGF e il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). Il peptide PEP1 o il PEPscr (di controllo, riarrangiato casualmente) diluiti in acqua, sono stati aggiunti alla soluzione contenente il fattore di crescita alla concentrazione

finale riportata in ogni esperimento. E' stata quindi analizzata la chemiotassi indotta dal bFGF (10ng/ml), o dal PDGF-BB (10ng/ml), o dal FCS (2%), misurata in assenza ed in presenza di 10ng/ml di PEP1 e PEP1scr.

Tutti i saggi di migrazione sono stati eseguiti alla temperatura di 37°C in 5% CO₂, per una durata complessiva di 5 ore; successivamente i filtri sono stati rimossi, fissati con etanolo assoluto e colorati con blu di toluidina. Le cellule migrate sono state quindi contate ad un ingrandimento 400X, in 15 campi per filtro, ed è stato riportato il numero medio di cellule per campo. Ogni esperimento è stato eseguito almeno tre volte in duplicato.

Gli esperimenti hanno evidenziato che, in tutti i casi, PEP1 inibisce significativamente e più del 50%, la migrazione delle BAEC, mentre PEP1scr non mostra alcun effetto (Figure 4A, 4B e 4C). Quando sono stati testati bFGF o PDGF-BB, PEP1 è stato utilizzato sia nella porzione superiore che in quella inferiore dell'apparato di Boyden, ed è stata osservata un'attività inibitoria lievemente migliore quando viene dispensato nella parte inferiore.

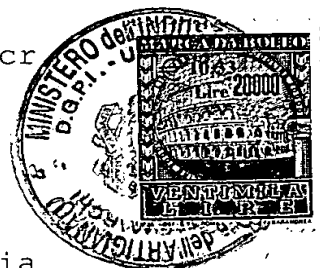
Contrariamente a ciò il controllo riarrangiato PEP1scr non mostra alcuna attività in entrambe le porzioni della camera di Boyden. Al fine di valutare

la specificità di tale effetto inibitorio è stato testato l'effetto di PEP1 su altri fattori chemioattrattivi. La migrazione delle cellule endoteliali indotta da aFGF o VEGF o EGF o Fibronectina non viene influenzata dal PEP1 né dal peptide PEP1scr (Figure 5A, 5B, 5C e 5D), indicando che la molecola in oggetto influenza specificamente bFGF e PDGF-BB.

Risultati simili sono stati ottenuti sulla chemiotassi di cellule RASMC indotte da PDGF-BB e FCS. PEP1 è in grado di inibire la migrazione delle RASMC del 60% circa, mentre la versione PEP1scr risulta inattiva (Figura 6).

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE

Il saggio di proliferazione è stato condotto sia su cellule primarie di aorta di ratto SMC che su cellule endoteliali bovine (BAEC). Le cellule sono state seminate in pozzetti da 6 (1×10^5 cellule/pozzetto), lasciate crescere per 24 ore in Dulbecco Modified eagle's medium (DMEM) addizionato con 10% FBS, alla temperatura di 37°C in 5% CO₂. Quindi, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno DMEM contenente 0.1 % BSA per 24 ore. Successivamente tale terreno è stato nuovamente sostituito con terreno fresco contenente solo 0.1 % BSA, oppure 0.1 % BSA e fattori di crescita alla



concentrazione finale di 10 ng/ml o siero fetale bovino (FCS) al 10%, il tutto in presenza o in assenza del peptide PEP1 o del peptide di controllo. Ogni saggio è stato effettuato a tempi crescenti fino ad un massimo di 3 giorni e le cellule sono state contate con un ematocitometro.

Il PEP1 è stato dapprima testato in esperimenti di dose-dipendenza: cellule di ratto RASMC nelle quali è stata indotta la proliferazione da FCS al 10%, sono state analizzate a 48 ore, in presenza ed in assenza di differenti dosi di PEP1 le cui concentrazioni variavano da 1 microgrammi/ml a 1pg/ml (figura 1). Come controllo sono stati utilizzati la forma denaturata al calore di PEP1 e la versione riarrangiata casualmente. Il PEP1 ha mostrato in questi esperimenti una attività inibitoria dipendente dalla dose utilizzata, che raggiunge il 60% di inibizione ad una concentrazione di 10ng/ml, mentre i peptidi di controllo non evidenziano alcuna attività. Di conseguenza la dose di 10ng/ml è stata scelta per i successivi esperimenti *in vitro*.

L'effetto del PEP1 è stato testato sulla proliferazione indotta dal PDGF-BB e dal bFGF (10ng/ml per ciascun composto), in cellule RASMC e in cellule BAEC. La figura 2A mostra il marcato

decremento della proliferazione indotta dal PDGF-BB. In esperimenti fermati a diversi tempi, la proliferazione indotta dal PDGF-BB (10ng/ml) viene significativamente inibita dalla presenza del PEP1 in tutti i punti analizzati. La presenza del PEP1 riesce quasi a bloccare completamente la proliferazione delle cellule, mentre il peptide di controllo riarrangiato (PEP1scr) non mostra alcun effetto a qualsiasi tempo testato (figura 2A).

La proliferazione spontanea (in presenza di albumina serica bovina, BSA) non viene influenzata in maniera significativa né da PEP1 né da PEP1scr a nessuno dei tempi analizzati, indicando che entrambe le molecole non risultano tossiche per sé alle dosi utilizzate sia sulle cellule RASMC (Figura 2B), che sulle cellule BAEC (figura 3B). PEP1 inoltre mostra un effetto inibitorio simile nelle cellule BAEC stimulate con bFGF (10ng/ml) (Figura 3A).

E' stato poi eseguito *in vivo* il seguente test:

ANGIOGENESI NELLE PLACCHE DI MATRICE EXTRA-CELLULARE

RICOSTRUITA

L'angiogenesi in placche di matrice extra-cellulare ricostituita (denominate "Matrigel", prodotte da Collaborative Biomedical Products, Beckton-Dickinson) è stata eseguita come riportato in

precedenza (Muhlhauser, J., 1995, *J. Circ. Res.*, 77, 1077-1086). Brevemente, sono stati iniettati per via sotto-cutanea in topi CD1 (femmine di 19 settimane di età), le placche di matrice extracellulare ricostruita addizionate con bFGF (150 ng/ml) in assenza o in presenza del PEP1 (10 microgrammi/ml). Il bFGF induce la formazione della rete dei capillari in 7 giorni, quindi le placche sono state espantate dopo 7 giorni dall'iniezione e incluse in paraffina. Le sezioni ottenute sono state colorate con la procedura tricromica di Masson, osservate con un analizzatore di immagine ottico, ed è stato quantificato il numero di vasi per mm^2 all'interno delle placche.

La figura 7 mostra la potente azione del peptide PEP1 nell'inibire la formazione dei vasi sanguigni indotta dal bFGF (ovvero 46% di inibizione rispetto al bFGF da solo). Dieci animali sono stati usati come controllo (trattati con solo bFGF) e quattordici animali invece sono stati trattati con bFGF in presenza di PEP1. Questo esperimento dimostra che il peptide PEP1 è in grado di inibire fortemente la nuova formazione di vasi sanguigni indotta dal bFGF ed indica che questa molecola costituisce un buon candidato per ulteriori studi *in vivo*.

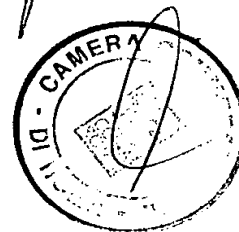
In conclusione:

- 1) PEP1 ha mostrato una potente e specifica azione-
inibitoria sulle proprietà mitogene e chemio-
attrattive del fattore di crescita derivato dalle
pistrine (PDGF-BB), del fattore di crescita dei
fibroblasti (bFGF) e del siero fetale bovino (FCS)
in vitro.
- 2) E' stata dimostrata una attività anti-angiogenica
in vivo in saggi che utilizzano le placche matrice
extra-cellulare ricostruita.

Questi risultati indicano il PEP1 come un ottimo
candidato per ulteriori ricerche in modelli animali
di crescita tumorale e metastasi, e di altre malattie
vascolari.

Maurizio SARPI

Stefano FERRARIO



RIVENDICAZIONI

- 1) Peptide avente la seguente struttura primaria:
Asp-Pro-His-Lle-Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu
- 2) Peptide avente una identità di sequenza di almeno il 60% con la sequenza secondo la rivendicazione 1.
- 3) Peptide avente una omologia di carica elettrica o idrofilia o idrofobicità o grado di esposizione al solvente o conformazione tridimensionale, pari ad almeno il 60% della sequenza secondo la rivendicazione 1.
- 4) Molecole peptidiche e non-peptidiche che mostrino una somiglianza conformazionale o di disposizione di gruppi funzionali, di almeno il 60% con la sequenza secondo la rivendicazione 1.
- 5) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 come inibitori del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF).
- 6) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 per fare un medicamento in grado di modificare la proliferazione cellulare.
- 7) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 per fare un medicamento in grado di modificare la migrazione cellulare e la migrazione

delle cellule neoplastiche verso potenziali siti di metastasi.

8) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 come inibitori della crescita di tumori primari e metastasi.

9) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 per fare un medicamento da utilizzare come coadiuvante nella terapia delle patologie neoplastiche e vascolari.

10) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 per fare un medicamento utilizzabile nel trattamento delle malattie vascolari.

11) Uso dei peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 per fare un medicamento utile nella terapia degli eventi trombotici e delle patologie associate.

Per la Richiedente

Il Rappresentante

Maurizio SARPI

Cell.

Studio FERRARIO

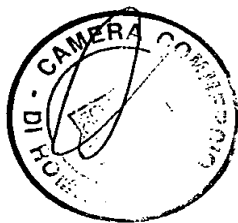
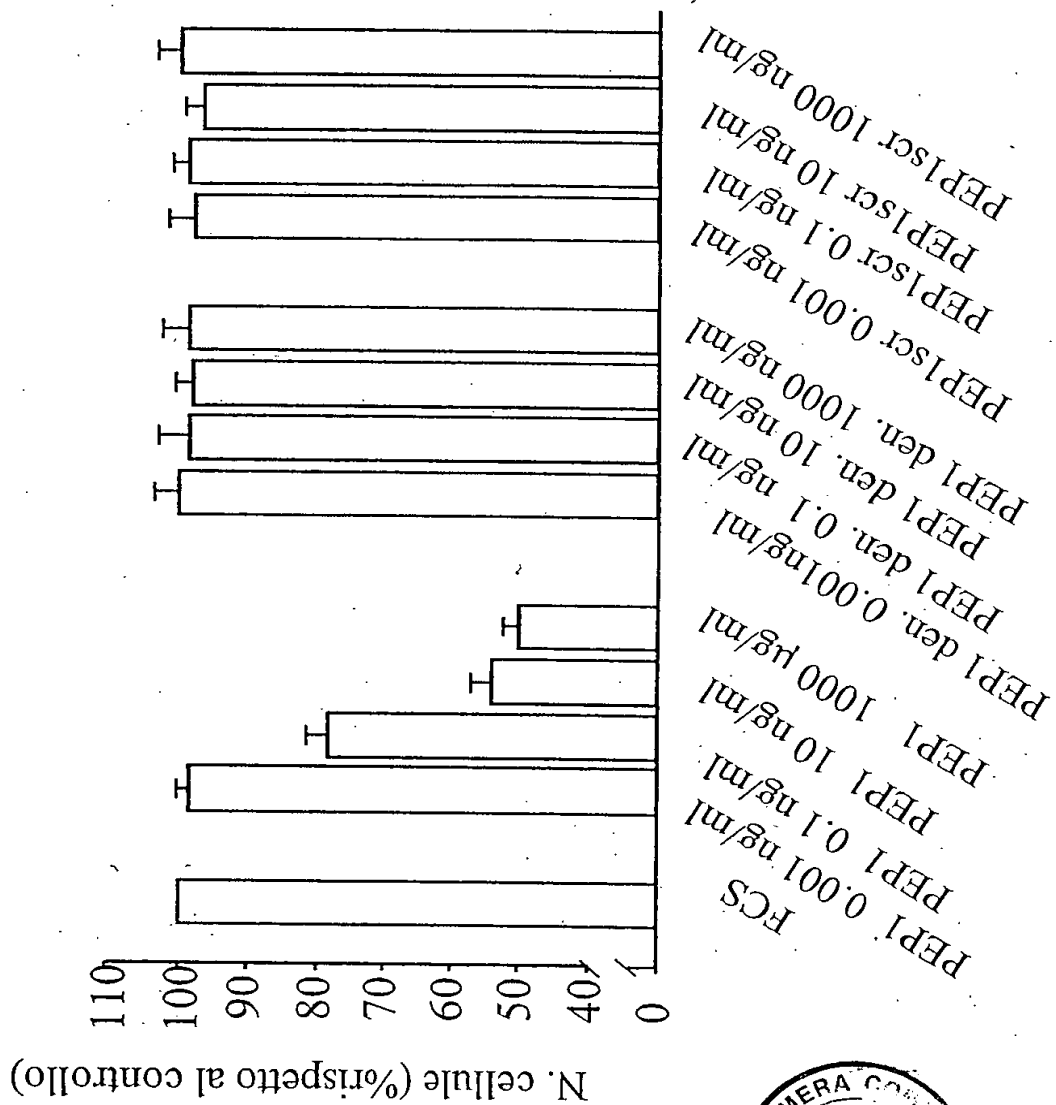


Fig. 1



RM2001 A 000088

Maurizio SARPI
del
Studio FERRARIO

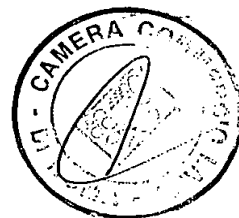


Fig. 2A

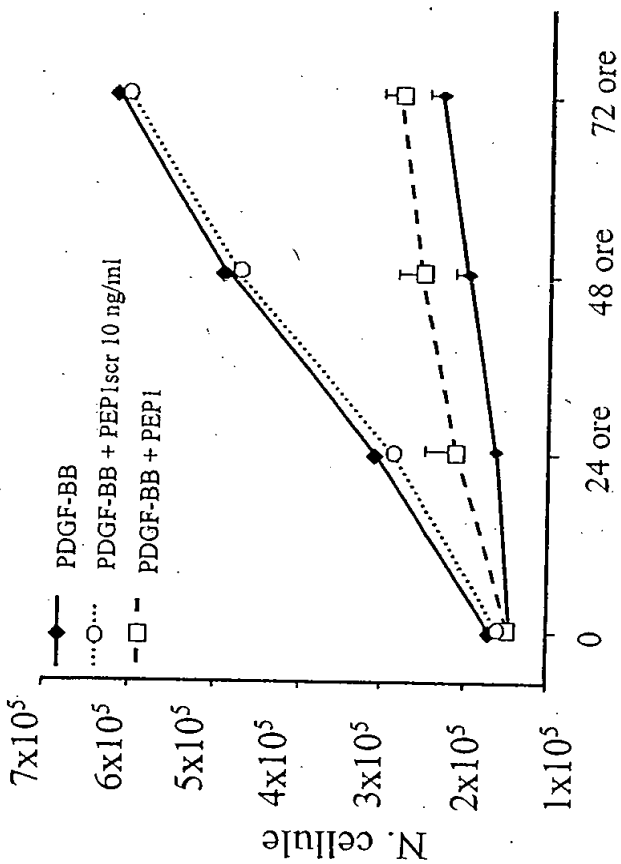
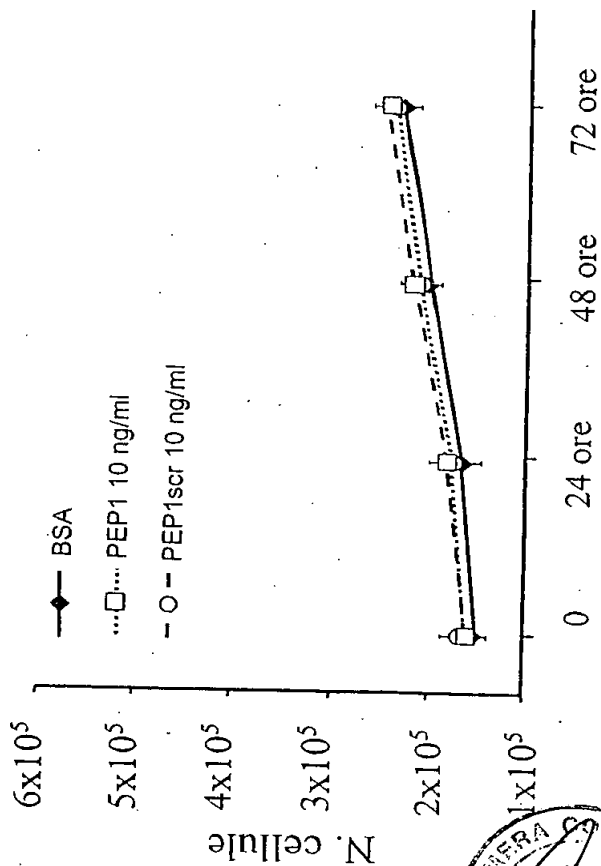


Fig. 2B



Maurizio SARPI
della
Studio FERRARIO



Fig. 3A

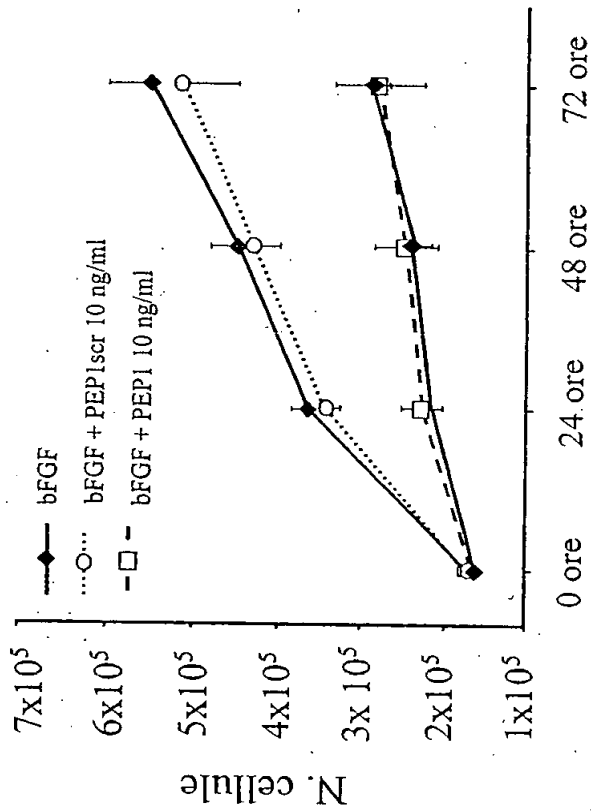
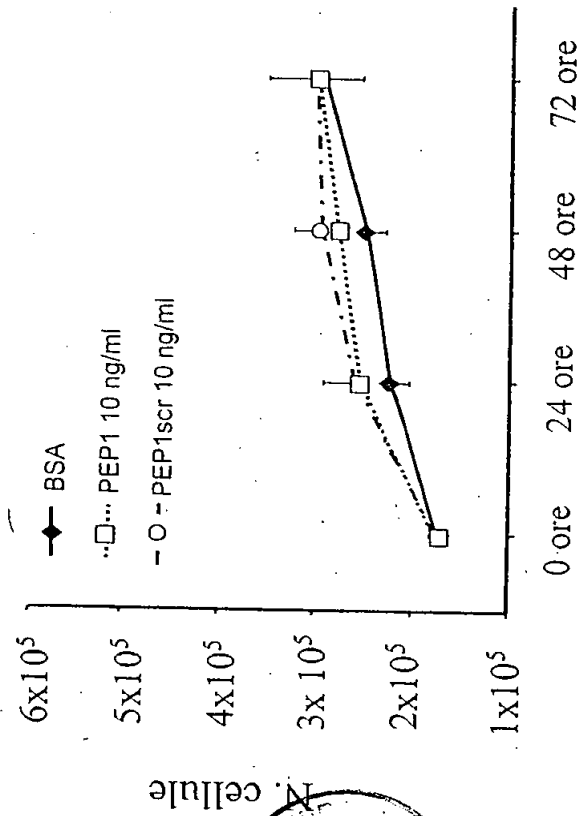


Fig. 3B



RM 2001 A 00008

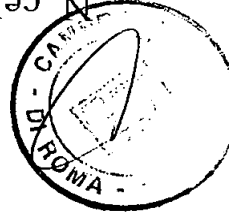
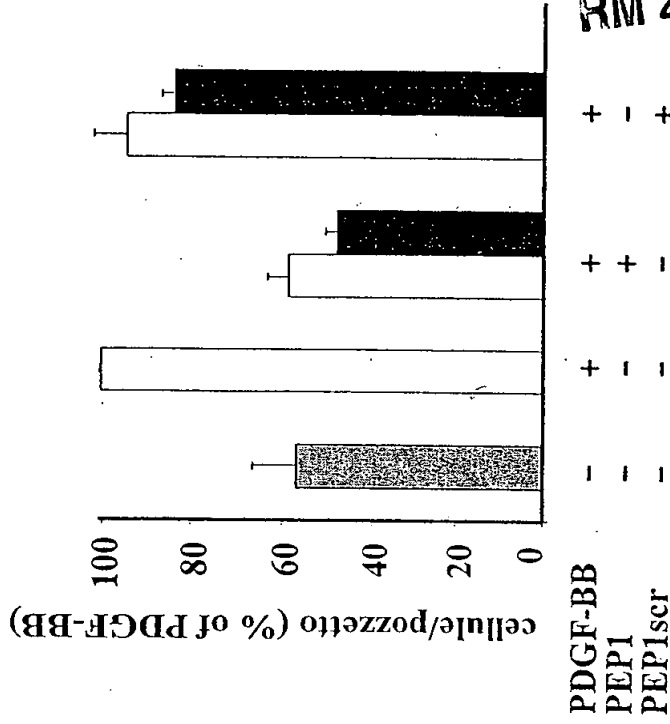
Maurizio S. PEP1
della
Studio FERRARIO

Fig. 4

B

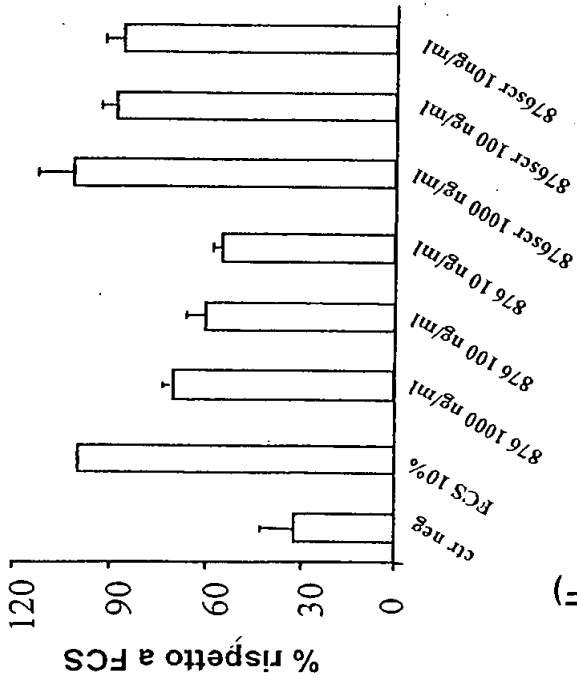


RM2001 A 000088



Maurizio SARPI
Studio FERRARIO

A



C

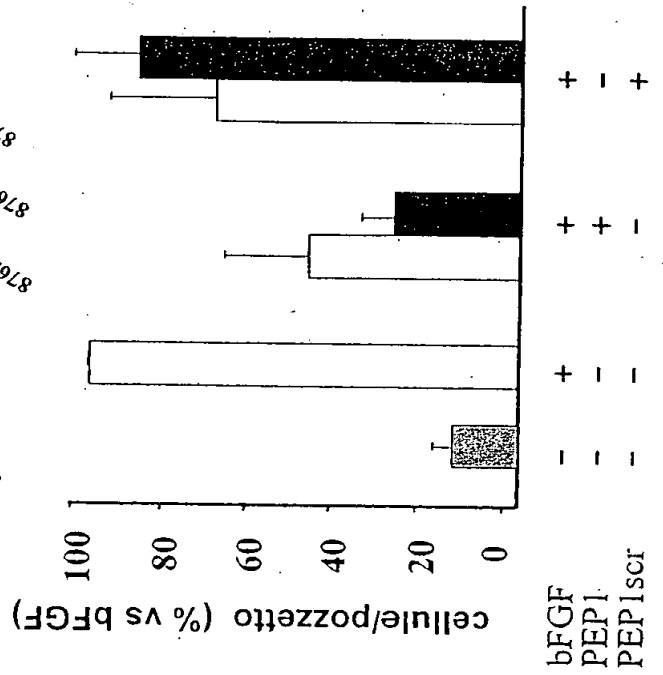


Fig 5

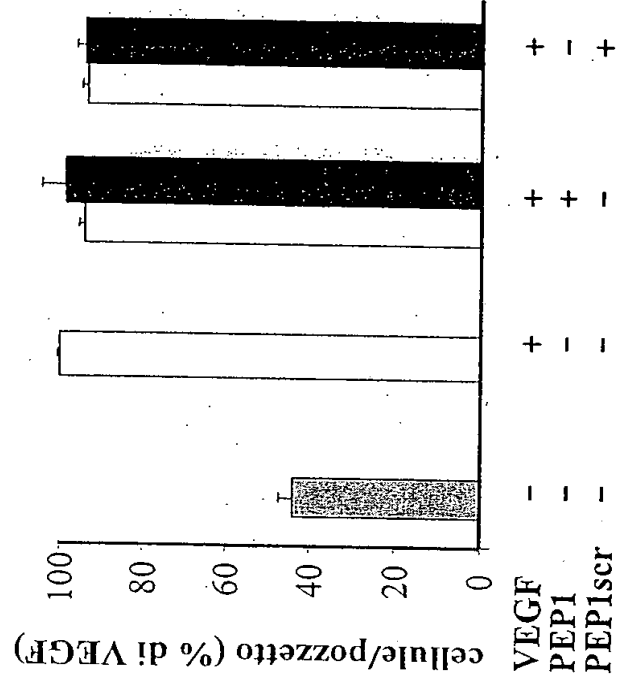
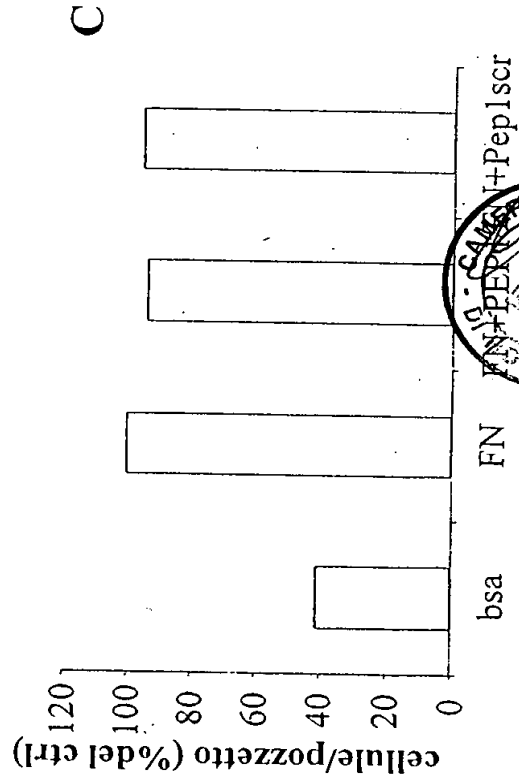
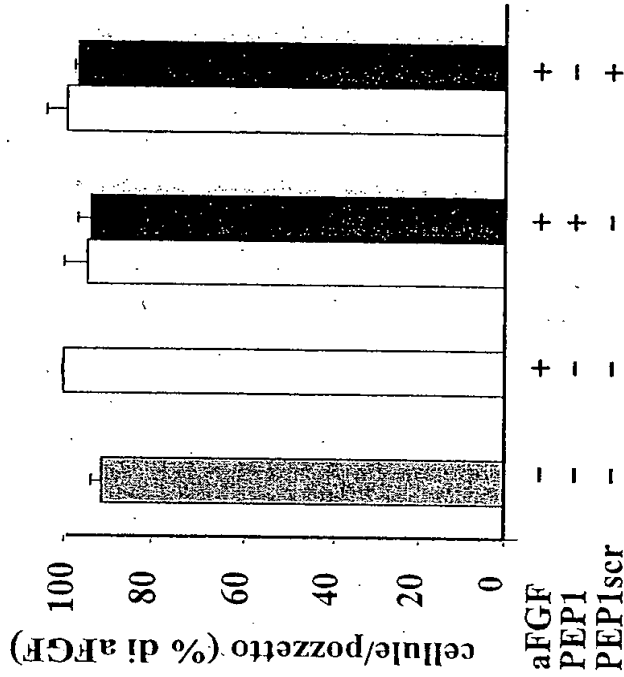
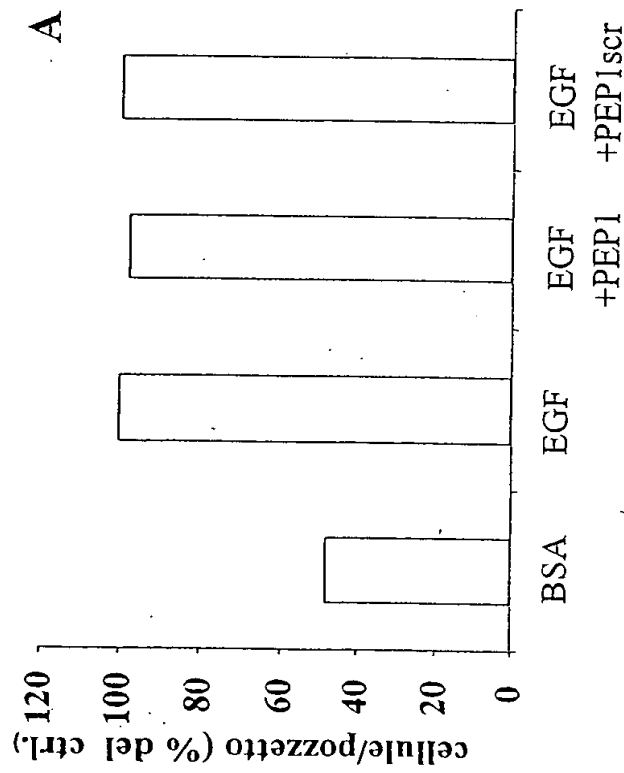
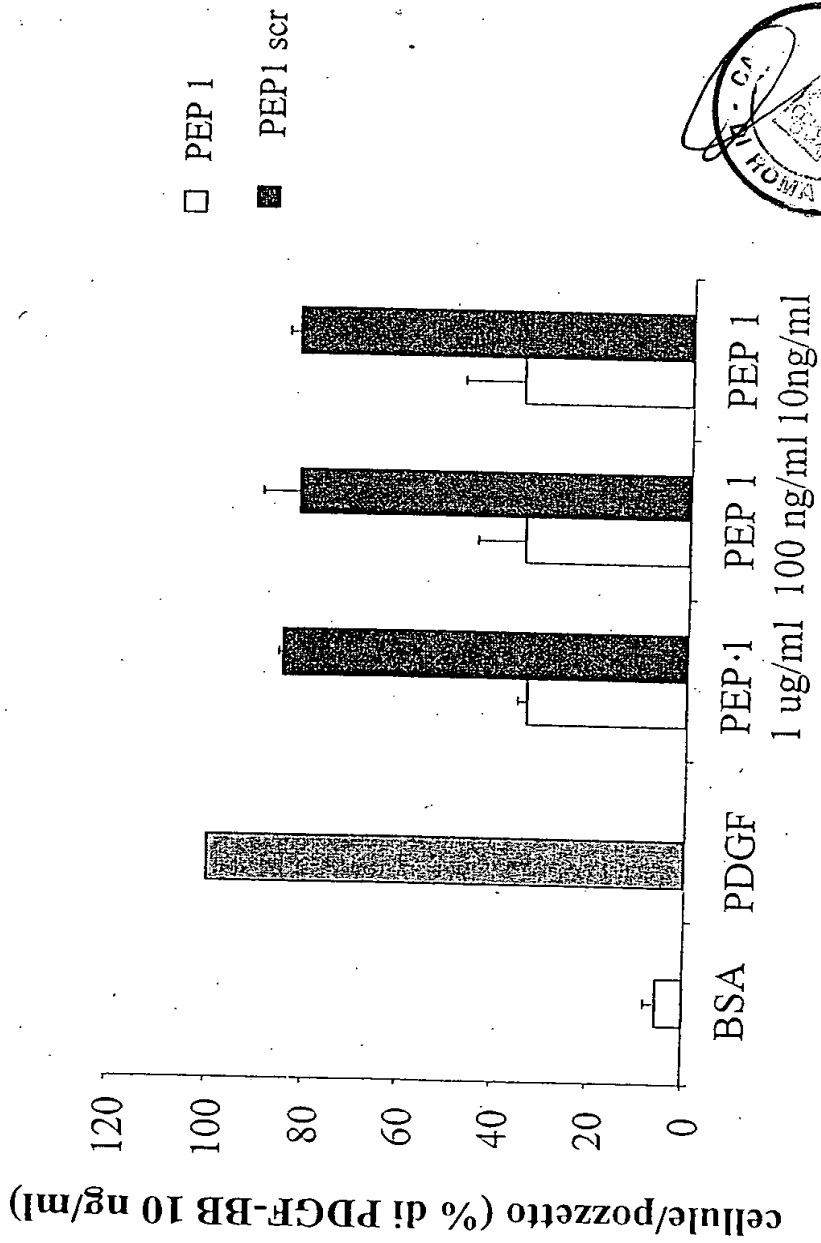
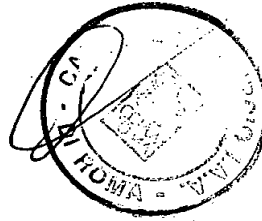


Fig. 6



RM 2001 A 000088



Maurizio SARPI

Studio FERRARIO

Fig. 7

RM2001 A 000088

Maurizio SARPI
dello
Studio FERRARIO